

**Vergleichende Untersuchungen
zur Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL und
Prüfung der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC
auf ihre Eignung für die Stickstoffbestimmung
in Fleischerzeugnissen**

Julia Stewens

1975

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs der Universität München
- Fachbereich Tiermedizin -

Vorstände: Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter und Prof. Dr. G. Terplan

Vergleichende Untersuchungen zur Stickstoffbestimmung
nach KJELDAHL und Prüfung der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC
auf ihre Eignung für die Stickstoffbestimmung
in Fleischerzeugnissen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Julia Stewens

aus
Nieukerk

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin

der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter
Korreferent: Prof. Dr. H. Erbersdobler

Tag der Promotion: 18. Juli 1975



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literatur	2
I. Die Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL	2
1. Chemische Vorgänge	3
2. Säurezugabe	4
3. Katalysatoren	5
4. Oxidation	6
5. Aufschlußzeit	7
6. Reduktion	7
7. Destillation und Titration	8
8. Mikro-KJELDAHL	9
II. Stickstoffbestimmung in automatischen Anlagen	11
C. Eigene Untersuchungen	15
I. Vergleichende Rohproteinbestimmungen von Fleisch- erzeugnissen mittels der konventionellen KJELDAHL-Methode und der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC	15
1. Material und seine Aufbereitung	15
a) Aufbereitung mit dem Fleischwolf	15
α) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V	15
β) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G	16
γ) Ergebnisse	17
b) Aufbereitung im ULTRA-TURRAX	18
α) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V	18
β) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G	18
γ) Ergebnisse	18
c) Aufbereitung durch Gefriertrocknung	20
α) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V	20
β) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G	20
γ) Ergebnisse	20
II. Vergleichende Rohproteinbestimmungen von Fleisch- erzeugnissen mit hohen Fett- bzw. Bindegewebsge- halten mittels der konventionellen KJELDAHL- Bestimmung und der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC	21
1. Material und seine Aufbereitung	22
a) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V	22
b) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G	22
c) Ergebnisse	22

III. Vergleichende Rohproteinbestimmungen von verschiedenem stickstoffhaltigen Untersuchungsmaterial mittels der konventionellen KJELDAHL-Bestimmung und der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC	23
1. Material	23
a) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V	23
b) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G	23
c) Ergebnisse	23
IV. Untersuchungen zur Sicherung der mittels der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC bestimmten Rohprotein-gehalte	24
1. Prüfung der Meßwerte für Rohprotein in Abhängigkeit von der Probeneinwaage bei Fleischerzeugnissen	25
a) Material und seine Aufbereitung	25
b) Ergebnisse	25
2. Auswirkung der Einwaagengenauigkeit auf die Meßwerte im KA-G	27
a) Material	27
b) Ergebnisse	27
3. Stickstoffbestimmungen in Substanzen mit definiertem Stickstoffgehalt mittels des KA-G	29
a) Material	29
b) Ergebnisse	29
4. Reproduzierbarkeit der mittels des KA-G erhaltenen Meßwerte für Rohprotein	30
a) Material und seine Aufbereitung	30
b) Ergebnisse	30
c) Berechnung der Reproduzierbarkeit	31
D. Diskussion	33
E. Zusammenfassung	38
F. Literaturverzeichnis	40
Lebenslauf	

A. E I N L E I T U N G

Bei der Beurteilung von Fleischerzeugnissen interessiert vorrangig der Gehalt an bindegewebeseiweißfreiem Fleisch-eiweiß. Seine Ermittlung erfolgte bisher indirekt, indem von den Gesamtstickstoffsubstanzen die Gehalte an Bindegewebeseiweiß, fremder Nichteiweiß-Stickstoffsubstanz und Fremdeiweiß in Abzug gebracht wurden.

Zwischenzeitlich wurde am Institut für Lebensmittelhygiene der Tierärztlichen Fakultät München eine Methode zur direkten Bestimmung des bindegewebeseiweißfreien Muskeleiweißes entwickelt. Bei dieser Methode wird nach Abtrennung des Bindegewebes, fremder Nichteiweiß-Stickstoffsubstanzen sowie Fremdeiweiß der Muskeleiweißanteil gravimetrisch bestimmt. Möglicherweise kann zukünftig im Routinebetrieb auf Rohproteinbestimmungen verzichtet werden. Völlig entbehrlich werden Stickstoffbestimmungen trotzdem nicht werden, in bestimmten Fragestellungen bleiben sie *conditio sine qua non*.

Seit Jahren bemüht man sich, die bisher übliche zeit- und materialaufwendige KJELDAHL-Methode zu rationalisieren und zu standardisieren. Seit kurzer Zeit wird nun von der Firma FOSS ELECTRIC, Dänemark, ein Gerät angeboten, das durch Automatisierung der KJELDAHL-Methode eine erhebliche Reduzierung des Zeit- und Arbeitsaufwandes ermöglichen soll.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, die konventionelle KJELDAHL-Methode mit der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC zu vergleichen und die Eignung des Gerätes für die Lebensmittelanalytik zu prüfen.

B. L I T E R A T U R

I. Die Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL

Fleisch und Fleischerzeugnisse enthalten als Hauptbestandteile Wasser, Asche, Fett und Eiweiß. Fleischeiweiß besitzt einen Stickstoffgehalt von ca. 16%. Aus dem Stickstoffgehalt läßt sich deshalb durch Multiplikation mit 6,25 ($= 100 : 16$) der Eiweißgehalt berechnen. Der Faktor 6,25 ist ein Konventionswert für den Rohproteingehalt ($N \times 6,25$). Es ist jedoch zu bedenken, daß andere Eiweißarten andere Stickstoffgehalte besitzen, sodaß dann andere Umrechnungsfaktoren (f) notwendig sind:

Milcheiweiß	6,38	
Gelatine und kollagenes Bindegewebe	5,50 - 5,55	
Getreideeiweiß	5,70	
Eiweiß aus Ölseen	5,30	(39)

Die Stickstoffbestimmung erfolgt allgemein nach dem von KJELDAHL (15) entwickelten Prinzip. Er hatte empfohlen, die Untersuchungssubstanz in konzentrierter Schwefelsäure bis zum Siedepunkt zu erhitzen und dann mit Kaliumpermanganat zu oxidieren, um so die Umsetzung des Stickstoffs in Ammoniumsulfat zu unterstützen. Dann sollte Phosphoranhhydrid zugeben und zwei Stunden erhitzt werden. Nun war die Lösung zu verdünnen, zu alkalisieren, Zink hinzuzufügen und in Schwefelsäure überzudestillieren. In das Destillat sollte zur jodometrischen Bestimmung des Säureverbrauchs durch Titration mit Natriumthiosulfat Kaliumjodid und Kaliumjodat gegeben werden.

Beim Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumpermanganat wird Kohlenstoff zu Kohlendioxid und Wasserstoff zu H_2O oxidiert, der Stickstoff in $(NH_4)_2SO_4$ übergeführt. Das Phosphoranhhydrid nimmt Wasser auf und unterstützt dadurch die hydrolytische Spaltung der Eiweißstoffe. Die Alkalisierung mit Natronlauge bewirkt dann das Austreiben von Ammoniak. Bei der jodometrischen Bestimmung ergeben sich

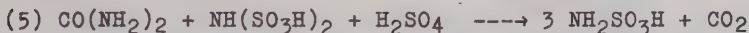
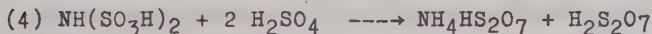
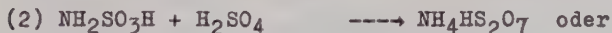
folgende chemische Reaktionen:



Diese 1883 entwickelte Methode setzte sich rasch durch. In zahlreichen Arbeiten wurden inzwischen Verbesserungen angeregt.

1. Chemische Vorgänge

Die chemischen Abläufe des Aufschlusses stickstoffhaltiger Substanzen sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Kohlenstoff und Wasserstoff werden zu CO_2 bzw. H_2O oxidiert. Nach SCHWAB und SCHWAB-AGALLIDIS (34) entsteht beim Einwirken der konzentrierten Schwefelsäure auf Aminverbindungen zunächst Sulfaminsäure ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$), die in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ übergeht. Am Beispiel von Harnstoff hat SCHWAB folgenden Reaktionsablauf angenommen:

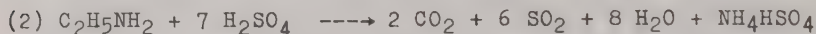
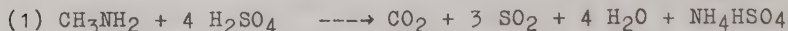


Aus den Ammoniumsalzen entsteht durch Alkalisieren freies Ammoniak. Das Ammoniak wird bei der Destillation in 0,1 n Schwefelsäure unter Bildung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aufgefangen.

Bei der anschließenden Titration wird mit 0,1 n Natronlauge ermittelt, wieviel von der vorgegebenen Schwefelsäuremenge durch das Ammoniak gebunden worden ist.

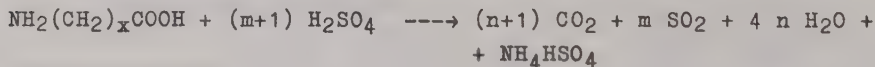
2. Die Säurezugabe

Konzentrierte Schwefelsäure ist zur Umsetzung von organischem Material zu CO_2 , H_2O und NH_3 erforderlich. 1912 stellte CARPIAUX (9) fest, daß bei zu geringer Säurezugabe Stickstoffverluste eintreten. Nach den von BRADSTREET (7) ermittelten Reaktionen läßt sich der Säureverbrauch, wie im folgenden am Beispiel primärer Amine gezeigt, errechnen:



für die Umsetzung von Verbindungen mit einer CH_2 -Gruppe werden 4 Mol H_2SO_4 benötigt, für jede weitere CH_2 -Gruppe je 3 Mol mehr.

Für Aminosäuren $(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_x\text{COOH})$ läßt sich folgende allgemeine Formel aufstellen:



Hierbei ist n = Anzahl der Kohlenstoffatome in der Alkylgruppe
und m = Summe von Kohlenstoff und Wasserstoff in der Alkylgruppe

MIDDLETON und STUCKEY (21) errechneten die benötigte Menge H_2SO_4 für die Umsetzung verschiedener organischer Stoffe:

1 g Kohlenhydrat verbraucht 4,0 ml konz. H_2SO_4

1 g Fett 9,7 ml konz. H_2SO_4

1 g Protein 4,9 ml konz. H_2SO_4

Säureverluste durch den Siedevorgang müssen extra berücksichtigt werden.

3. Katalysatoren

Der Ablauf chemischer Reaktionen wird durch Katalysatoren beschleunigt. Katalysatoren gehen mit den Ausgangsstoffen reaktionsfähige Zwischenverbindungen ein, und die benötigte Aktivierungsenergie wird herabgesetzt. Nach Ablauf der Reaktion liegt der Katalysator wieder unverbraucht vor.

Da der Aufschluß mit Schwefelsäure allein nur langsam vor sich geht, wurden geeignete Katalysatoren gesucht.

WILFARTH (41) empfahl den Gebrauch von Metallen. Er entdeckte, daß Kupfersalze ebenso wie die Oxide von Mangan, Wismuth, Eisen und Quecksilber aufgrund ihrer stark oxidierenden Wirkung die Aufschlußzeit unterschiedlich verkürzen.

Quecksilberoxid führt bei der Alkalisierung allerdings zu Komplexbindungen, so daß vor der Destillation noch eine Fällung mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ erforderlich wird, wobei die Amidoquecksilbersalze umgesetzt werden. Es entsteht zunächst HgS_2O_3 , das dann in HgS und H_2SO_4 zerfällt.

HADORN und OBRIST (14) bestätigten, daß Quecksilbersalze offenbar für einen vollständigen Aufschluß unentbehrlich sind, da cyclisch gebundener Stickstoff nur durch Quecksilber erfaßt wird. Allerdings führt zu langandauerndes Erhitzen zu Stickstoffverlusten.

Selen, von LAURO (18) eingeführt, zeigt zwar geringere Wirkung, hat aber gegenüber Quecksilber den Vorteil, daß Komplexbindungen nicht auftreten. Nach MILBAUER's (22) Versuchen mit Rohrzucker ist Selen der wirksamste Einzelkatalysator, Selendioxid-Kupfersulfat im Verhältnis 1:1 sowie Selendioxid-Kupfersulfat im Verhältnis 3:1 waren die wirksamsten Gemische. Später kam MILBAUER (23) zu dem Ergebnis, daß Selendioxid-Quecksilbersulfat am wirksamsten ist und zwar bei einem Mischungsverhältnis 4:1.

Heute werden folgende Katalysatoren empfohlen:

SCHORMÜLLER (33) empfiehlt ein Gemisch aus

80 g K_2SO_4 , 20 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$ und 0,34 g SeO_2 . Davon werden 3 g je Probe zugegeben.

WILLITS (42) verwendet 15,0 g K_2SO_4 und 0,50 g HgO pro Probe.

In der Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der N-Substanz nach KJELDAHL im Schweizer Lebensmittelbuch (45) werden vom Katalysatorgemisch 100 g K_2SO_4 (krist.), 3 g HgO und 0,3 g Se 3 g pro Probe zugegeben.

HADORN und OBRIST (14) empfehlen ein Gemisch aus 100 g K_2SO_4 (krist.), 3 g HgO und 2 g V_2O_5 und davon 3 g pro Probe zu verwenden.

4. Oxidation

Das von KJELDAHL zur Erzielung einer vollständigen Oxidation verwendete Kaliumpermanganat ($KMnO_4$) wurde später von PHELPS (28) und SALKOWSKI (30) abgelehnt, da die Ergebnisse sehr unterschiedlich waren. BEET (4) benutzte es weiterhin zum Nachweis von Stickstoff in Kohle mittels einer Semi-Mikro-Methode.

KLEEMANN (16) empfahl statt $KMnO_4$ 30%iges Wasserstoffperoxid um die Aufschlußzeit zu verkürzen und um einem Schäumen besonders bei organischem Material zu steuern.

Versuche mit Perchlorsäure sind mit unterschiedlichem Erfolg durchgeführt worden. WICKS und FIRMINER (40) beobachteten bei ihren Untersuchungen Stickstoffverluste, dagegen berichteten RUBIO-PACHECO, LOPEZ-RUBIO und MARQUEZ (29) über gute Ergebnisse mit Bodenproben. Die Aufschlußzeit wurde erheblich verkürzt.

SCOTT und MEYERS (35) erprobten die Zugabe von Kaliumpersulfat. Bei Zugabe von zu großen Mengen kam es allerdings wieder zu Stickstoffverlusten.

Da nicht alle Stoffe bei der normalen Siedetemperatur der Schwefelsäure (338°C) aufgeschlossen werden, schlug GUNNING (13) zur Erhöhung der Siedetemperatur die Verwendung von Kaliumsulfat vor. Mit verschiedenen großen Zugaben erhöhten MCKENZIE und WALLACE (19) die Temperatur auf 450°C und BAKER (3) auf 410°C . K_2SO_4 ist in allen heute üblichen Katalysatorgemischen enthalten. Auch BRADSTREET (8) verwendete Salze (KSO_4 , NaSO_4), um durch die Erhöhung der Molarität den Siedepunkt zu erhöhen. Die Erhöhung der Temperatur hielt er für wichtiger als die Beschleunigung der Reaktion mit H_2O_2 . Nach seiner Meinung könnte eine zu rasche Oxidation die Reduktion des Stickstoffs eventuell behindern.

5. Aufschlußzeit

Die Zeitdauer des Aufschlusses ist u.a. abhängig von dem zu untersuchenden Material. Mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. Reis, Weizen, Hafermehl und Kleie (5), müssen die Substanzen nach dem Klar- bzw. Farbloswerden weitergekocht werden, um die vollständige Reduktion der N-Verbindungen zu garantieren.

SHIRLEY und BECKER (36) erzielten eine Aufschlußzeit von 3 - 4 Std. bei Nicotinsäure bei Verwendung von Selen als Katalysator und Kaliumsulfat zur Siedepunkterhöhung.

MILLER und HOUGHTON (24) erreichten mit Quecksilberoxid und Kaliumsulfat innerhalb von 6 Std. einen vollständigen Aufschluß von Proteinen und Aminosäuren.

MCKENZIE und WALLACE (19) beschreiben eine Aufschlußzeit von 55 Min. für Tryptophan.

6. Reduktion

Da die KJELDAHL - Methode bei manchen N - Verbindungen nicht befriedigte, wurde die Reduktion der Stickstoffverbindungen verbessert. U.a. wurde mit Zink (12), Kupfer (17), Titanchlorid (37), Salicylsäure und Glucose (38) gearbeitet, um damit heterocyclisch gebundenen Stickstoff freizusetzen.

7. Destillation und Titration

KJELDAHL verdünnte nach dem Aufschluß den Kolbeninhalt mit destilliertem Wasser, alkalisierte und destillierte dann in eine bekannte Menge Schwefelsäure über. Der Verbrauch der Schwefelsäure wurde jodometrisch bestimmt.

Wie bei KJELDAHL wird heute üblicherweise mit destilliertem Wasser verdünnt; dann wird mit Natronlauge unterschichtet. Sofern Quecksilberkatalysatoren zur Anwendung kommen, muß zur Lösung der sich bildenden Komplexbindungen noch Natriumthiosulfat oder Kaliumsulfid hinzugegeben werden. Quecksilber und seine Salze sind die einzigen Katalysatoren, die eine solche Behandlung vor der Destillation erforderlich machen.

BRADLEY (6) vollzog ebenso wie später CHAND (10) die Destillation und Titration in einem geschlossenen System. BÜCHI entwickelte dann eine Destillationsapparatur, welche die Destillation innerhalb von 4 Min. ermöglicht. Sie arbeitet mit einem elektrolytfreien Dampfgenerator. Der verbrauchte Inhalt des Destillationskolbens wird durch Unterdruck abgesaugt. Mehr Zeit erfordert die Destillation mit der Apparatur nach PARNAS - WAGNER, da der Destillationskolben nicht mittels eines Generators, sondern über der Flamme oder Heizplatte erhitzt werden muß.

Das bei der Alkalisierung freigesetzte Ammoniak wird nach der Destillation in einer bekannten Menge Schwefelsäure oder Borsäure mit einem Indikatorzusatz aufgefangen. Als Indikatoren werden Methylorange, Kongorot (44) bzw. Methylrot und Methylenblau (43,45) u.a. verwendet. Der am häufigsten verwendete Indikator ist eine 0,1%ige alkoholische Lösung von Methylrot und Methylenblau im Verhältnis 4 : 1. Er wurde von WILLITS, JOHN und ROSS (43) beschrieben. WYLER (45) gibt das Mischungsverhältnis mit 1 : 1 an.

Methylrot ist mit einem Umschlagbereich von pH 4,4 bis 6,2 der eigentliche Indikator. Der Umschlag erfolgt von rot nach orange. Um aber den Umschlagzeitpunkt präziser beobachten zu können, wird Methylenblau als Farbstoff zugegeben. Damit schlägt die Farbe jetzt von blaurot im sauren Bereich über farblos-grau

im neutralen Bereich nach grün im alkalischen Bereich um. Da der stöchiometrische Endpunkt der Titration mit Borsäure bei pH 4,7 liegt, ist Methylrot-Methylenblau als Indikator sehr gut geeignet.

HADORN und OBRIST (14) beschreiben einen zweistufigen Mischindikator für die Titration in Borsäure: 0,35 g Bromkresolgrün gelöst in 10 ml Alkohol mit Zusatz von 10 ml 0,1 n NaOH, 200 ml Wasser, 22 ml 1%ige wässriger Neu-Coccinlösung (Agfa, Leverkusen) und 0,75 g p-Nitrophenol gelöst in 5 ml Alkohol; dies wird dann mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Dieser Indikator hat den Vorteil, daß zunächst bis zum Farbumschlag nach blau ("Warnpunkt") rasch titriert werden kann. Danach erfolgt dann die Titration tropfenweise weiter bis zum zweiten Umschlagpunkt nach graubraun ("Äquivalenzpunkt der Titration"). Zur Titration wird 0,1 n NaOH verwendet. Man benötigt also zwei eingestellte Maßlösungen, mit denen vor Beginn der eigentlichen Titration ein Blindversuch vorzunehmen ist.

8. Mikro - KJELDAHL

Die Mikro - Methode wird verwendet zum Aufschluß von Proben, deren Menge gering ist oder bei denen ein hoher Stickstoffgehalt zu erwarten ist.

Dem Prinzip der Makro - Methode folgend werden hierbei die gleichen Chemikalien benötigt (27), wobei die Menge des Zusatzes sich nach der Menge der Einwaage richtet.

Für die Makro - KJELDAHL - Methode veröffentlichten HADORN und OBRIST (14) folgende Arbeitsvorschrift:

"a. Aufschluß

Die Einwaage richtet sich nach dem Proteingehalt des zu untersuchenden Materials. Sie schwankt in der Regel zwischen 0,2 und 1 g Trockensubstanz.

- Fein pulverisierte oder gut homogenisierte Probe einwiegen und in 100 ml-Kjeldahl-Kolben geben.
- 3 g Katalysatormischung zugeben.
- Die zum Aufschluß erforderliche Menge konzentrierter Schwefelsäure zugeben. Nachdem die organische Substanz oxidiert ist, sollen noch 5 - 6 ml konz. Schwefelsäure

im Kolben verbleiben. Die zum Aufschluß benötigte Schwefelsäuremenge kann nach der Methode von MIDDLETON und STUCKEY (21) berechnet werden.

- Glasperle zugeben und Kolbenhals mit einer gestielten Glaskugel lose verschließen.
- Kolben umschwenken bis das gesamte Material mit der Säure durchtränkt ist.
- Kolben auf Infrarot-Aufschluß-Apparatur setzen und vorsichtig anheizen. Falls die Substanz schäumt, eine kleine Messerspitze voll Stearinsäure als Schaumbekämpfungsmittel zufügen.
- Erhitzen, bis Lösung leicht kocht und nach wenigen Minuten klar erscheint. Von diesem Moment an noch mindestens 20 Min. lang weitererhitzen, wobei die Lösung ganz leicht sieden soll. Bei Verwendung des Katalysators für Schnellaufschluß darf das Nacherhitzen nicht länger als 30 Min. dauern, da sonst Stickstoffverluste auftreten können.
- In analoger Weise wird ein Blindversuch mit dem Katalysator und der entsprechenden Menge Schwefelsäure angesetzt.

b. Destillation

- Nach dem Erkalten des Kolbens die Aufschlußlösung mit ca. 10 ml Wasser verdünnen und abkühlen lassen.
- Flüssigkeit quantitativ in die Destillationsapparatur spülen.
- Als Vorlage dient ein 100 ml-Erlenmeyerkolben, der ca. 20 ml Borsäurelösung mit Mischindikator enthält. Das Kühlerrohr der Destillationsapparatur soll in die Lösung eintauchen.
- 15 bis 20 ml Natronlauge-Thiosulfat-Lösung zur Aufschlußlösung geben, Apparatur schließen und mit der Wasserdampfdestillation beginnen. Vom Moment an, da Wasserdampf ins Kühlrohr gelangt (Umschlag des Mischindikators von graubraun nach grün) wird noch 3 Min. destilliert.
- Vorlage soweit senken, bis das Kühlrohr nicht mehr eintaucht. In dieser Stellung noch 1 Min. lang weiterdestillieren.

- Kühlrohr außen abspülen, Destillation abbrechen.

c. Titration

- Vorlage mit 0,1 n Salzsäure titrieren. Zuerst wird rasch titriert bis zum Farbumschlag nach blau, (1. Umschlagpunkt = Warnpunkt). Dann wird vorsichtig tropfenweise titriert bis zum Farbumschlag nach grau-braun (2. Umschlagpunkt = Äquivalenzpunkt der Titration)."

Es folgt die Berechnung.

II. Stickstoffbestimmung in automatischen Anlagen

Sowohl beim Aufschluß als auch bei der Destillation und der Titration ergeben sich durch individuelle Arbeitsweisen Fehlerquellen.

Der enorme Zeitaufwand - ca. 8 Std. bei Fleischerzeugnissen - muß bei der Routineuntersuchung im Labor als Nachteil betrachtet werden. Da außerdem beim Aufschluß Gase (SO_2 , SO_3) entweichen, ist ein Abzug erforderlich. Somit ist die Durchführung der Stickstoffbestimmung auch von baulichen Einrichtungen abhängig. Zudem ist der Materialaufwand nicht unerheblich.

Zur Vereinfachung und Beschleunigung der Stickstoffbestimmung sind in den letzten Jahren verschiedene Apparate entwickelt worden, die eine halb- oder vollautomatische Bestimmung ermöglichen.

ARNETH (1) berichtet über die Eignung des Analysenautomaten "BRAUN-Systematik" für die routinemäßige Bestimmung des Hydroxypolin- und Gesamteiweißgehaltes von Fleisch und Fleischwaren. Die "BRAUN-Systematik" ermögliche eine zügige und sichere Ausführung dieser Bestimmungen. Für die Arbeit im Analysenautomaten müssen die zu untersuchenden Proben sowohl für die Stickstoff- als auch für die Hydroxyprolinbestimmung in der bisher geübten Weise aufgeschlossen bzw. hydrolysiert werden. DAVIDSON (11) berichtet über die Verwendung der TECHNICON-Apparatur (Autoanalyzer) zur KJELDAHL - Bestimmung, wobei der Aufschluß der Proben nach 2 Std. abgeschlossen ist. Über die gleichzeitige Bestimmung von Stickstoff und Phosphat aus nicht

vorbehandeltem Probenhomogenisat sowie über die gleichzeitige Bestimmung von Stickstoff, Phosphat, Hydroxyprolin und Chlorid aus einem Schwefelsäurehydrolysat der Probe berichten SCHMIDHOFER, EGLI und WEBER (31) sowie SCHMIDHOFER, EGLI, HAUSER und KÜNZLER (32). Aus dem Schwefelsäurehydrolysat der Untersuchungsproben werden mit einer Frequenz von 20 Proben pro Std. gleichzeitig Stickstoff, Phosphat, Hydroxyprolin und Chlorid bestimmt.

Die Stickstoffbestimmung mit der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC^{x)}

Zur Ausschaltung von Nachteilen der Macro-KJELDAHL-Methode zur Stickstoffbestimmung hat AEGIDIUS ein Gerät entwickelt, in welchem die Analysen automatisch durchgeführt werden. Fehlerquellen aufgrund individueller Arbeitsweisen werden somit beseitigt.

In dem Gerät wird die Analyse in fünf Schritte von je 3 Min. Dauer aufgeteilt. In der technischen Anlage der Automatik sind sechs Kjeldahl-Kolben mit Glasdeckel und Ansatzstutzen zum Absaugen der Gase (SO_2 , SO_3) an einem Drehkranz befestigt.

In Position 1 des Kolbens erfolgt die Eingabe der in stickstoffarmem Papier eingewogenen Probe, des Katalysators (hier 3 Tabletten zu je 5 g K_2SO_4 + 0,25 g HgO) und 30%igen H_2O_2 . Nach 3 Min. rückt der Kolben um 60° weiter in Position 2, wo über drei automatisch gezündeten Gasbrennern (Propan, Butan) der Kolbeninhalt sehr rasch bis zum Sieden erhitzt wird. Nach weiteren 3 Min. rückt der Kolben in Position 3 vor, wo die Erhitzung bis auf 410° C stattfindet. In Position 4 wird dann mittels eines Gebläses der Kolben abgekühlt und der Kolbeninhalt mit 140 ml Leitungswasser verdünnt.

x)

Der von AEGIDIUS entwickelte Apparat wird von der Fa. N.Foss Electric A/S, Hillerød, Dänemark hergestellt und unter der Bezeichnung "KJEL-FOSS MACRO-Automatic" vertrieben. Repräsentant ist die N. Foss Electric A/S GmbH in Hamburg.

In Position 5 wird nach automatischer Zugabe von 50 ml Natronlauge -Natriumthiosulfatlösung (5:1) zwecks Fällung des Quecksilbers und Freisetzung des Ammoniaks mit Wasserdampf destilliert und in einem Becherglas nach Zugabe von Indikatorlösung kontinuierlich mit Schwefelsäure (ca. 0,6%ig) titriert. In Position 6 erfolgt die Absaugung des Inhalts.

Bei der Titration wird der Farbumschlag mit einer Fotozelle erfaßt. Der Verbrauch an Schwefelsäure, der dem Stickstoffgehalt proportional ist, wird sofort über eine Digitalanzeige sichtbar gemacht. An der Anzeige, die drei Ziffern aufweist, läßt sich sowohl der Stickstoffwert als auch der Proteingehalt, mit einem beliebigen Faktor berechnet, ablesen. Um gleichmäßige Werte zu erhalten, wird das Gerät täglich mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösungen, jeweils einer hohen (39,7 % N x 6,25) und einer niedrigen Konzentration (0,5 % N x 6,25), geeicht.

Je Probe werden folgende Chemikalien benötigt:

10 - 15 ml	konz. H_2SO_4
10 ml	35%iges H_2O_2
20 g	NaOH
4 g	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
0,5 ml	Indikatorkonzentrat
110 ml	Aqua dest.
3 Stck.	KJEL-TABS
	(=15,0 g K_2SO_4 + 0,75 g HgO)

Bei kontinuierlichem Lauf werden pro Std. 500 g Gas (Propan/Butan), 240 l Wasser und 300 bis 1100 VA elektrische Energie verbraucht.

Die äußeren Abmessungen des Gerätes sind:

Länge 130 cm; Breite 78 cm; Höhe 111 cm

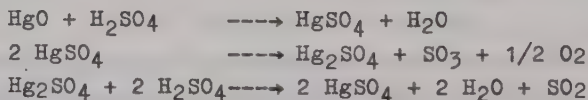
In unmittelbarer Nähe müssen zwei Gasflaschen und ein Behälter zum Auffangen des Abwassers aufgestellt werden. Ein Abzug ist nach Angaben des Herstellers nicht erforderlich, da entstehende Gase kontinuierlich abgesaugt werden. Der KJEL-FOSS Automat wurde bereits von OBERRIETH und MERMELSTEIN (26) beschrieben.

Die chemischen Reaktionen der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC entsprechen denen der konventionellen KJELDAHL-Methode. Nach Eingabe der Probe werden H_2O_2 und konzentrierte Schwefelsäure mittels Hebeldruck zugeführt. Sie bewirken die Oxidation von Kohlenstoff zu Kohlendioxid und von Wasserstoff zu H_2O . Das gebildete H_2O übernimmt in der Aufheizphase die Rückspülfunktion von eventuell verspritzten Partikeln der Probensubstanz (25). Die Reaktionsmechanismen beim Einwirken der konzentrierten Schwefelsäure auf die Stickstoffverbindungen sind unverändert. Die benötigte Menge an konzentrierter Schwefelsäure pro Gramm der Probe gibt AEGIDIUS wie folgt an:

für 1g Kohlenhydrat	7,3 ml konz. H_2SO_4
1g Fett	17,8 ml konz. H_2SO_4
1g Protein	8,1 ml konz. H_2SO_4

AEGIDIUS weicht aufgrund der höheren Arbeitstemperatur von den für die konventionelle Methode von HADORN und OBRIST (14) errechneten Verbrauchswerten erheblich ab. Erreicht wird die Siedepunkterhöhung durch Zugabe von K_2SO_4 in den sog. KJEL-TABS; sie ist proportional der molaren Konzentration ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2 \text{KHSO}_4$).

Das ebenfalls in den KJEL-TABS enthaltene Quecksilberoxid wirkt stark oxidativ:



Die Quecksilbersalze, die mit Ammoniumsalzen Verbindungen eingehen, (ein Quecksilber (II)-ion ist in der Lage 4 NH_3 -Moleküle zu binden) werden, wie bereits beschrieben, ausgefällt. Die Destillation erfolgt unter Druck mit Wasserdampf und soll innerhalb von 3 Min. abgeschlossen sein.

Titriert wird gegen Schwefelsäure (30ml konz. H_2SO_4 auf 5000 ml Aqua dest.) mit Methylrot-Methylenblau als Indikator. Durch die direkte Titration kann eine Maßlösung eingespart werden.

C. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

I. Vergleichende Rohproteinbestimmungen von Fleischerzeugnissen mittels der konventionellen KJELDAHL-Methode und der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC

Um die Genauigkeit der N-Bestimmung mittels der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC (KA-G) zu überprüfen, wurden Würste sowohl mittels des konventionellen KJELDAHL-Verfahrens (kK-V) als auch mittels der genannten Anlage untersucht.

1. Material und seine Aufbereitung

Untersucht wurden feingekutterte Brühwürste ohne Einlagen (Gelbwurst, Wiener, Fleischwurst) und mit Einlagen (Schinkenwurst), Kochwürste (feingekörnte Leberwurst, grobe Leberwurst, Blutwurst und Leberpressack) sowie schnittfeste feingekörnte Rohwurst (Cervelatwurst) und schnittfeste grobgekörnte Rohwurst (Pfeffersalami, Landjäger, Debreziner).

a) Aufbereitung mit dem Fleischwolf

Für die Untersuchung wurde das Probenmaterial zweimal im Wolf mit einer 2-mm Scheibe zerkleinert.

α) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V

Für die Rohproteinbestimmung mittels des kK-V wurden vom Untersuchungsmaterial jeweils 10 Doppelbestimmungen angesetzt. Von jeder Probe wurden 2000 mg in Kjeldahl-Kolben eingewogen und mit 40 ml konz. Schwefelsäure versetzt, zwei Spatelspitzen Selenreaktionsgemisch nach WIENINGER zugefügt und 5 1/2 Std. unter dem Abzug aufgeschlossen. Nach dem Abkühlen wurde der Inhalt der Kolben quantitativ in 250 ml-Meßkolben übergeführt und mit destilliertem Wasser bis zur Meßmarke aufgefüllt. 25 ml dieser Lösung wurden in der Destillationsapparatur nach BÜCHI mit Natronlauge alkalisiert und destilliert. Die Destillation war nach 4 Min. abgeschlossen, und das Ammoniak wurde in einer Vorlage von 20 ml 0,1 n Schwefelsäure mit Methylrot-Methylenblau als Indikator aufgefangen. Anschließend

erfolgte die Titration mit 0,1 n Natronlauge. Der Rohprotein-
gehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Rohprotein} = \frac{(Y - Z) \times Q \times V \times 100}{E} \times 6,25$$

Hierbei bedeuten:

Y = Menge der vorgelegten 0,1 n H₂SO₄ in ml

Z = Menge der zurücktitierten freien H₂SO₄ in ml

Q = Äquivalenzfaktor (1ml 0,1 n H₂SO₄ = 0,0014 g N)

V = Verdünnungsfaktor

E = Einwaage

β) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G

Von jeder Probe wurden 1000 mg entsprechend der Bedienungs-
anleitung des Gerätes in ein Spezialpapier mit einem geringen
Gehalt an Stickstoffverbindungen (0,02%) eingewogen und vom
Untersuchungsmaterial jeweils zehn Doppelbestimmungen durch-
geführt.

Nach der Zugabe von je 3 KJEL-TABS (Katalysatorenngemisch, be-
stehend aus 15,0 g K₂SO₄ und 0,75 g HgO) und durch Hebelndruck
am Gerät einer, je nach Fettgehalt zu variierenden Menge
(zwischen 12 - 15 ml) konz. Schwefelsäure in den Kolben, wurden
die Proben eingegeben und der Glasdeckel geschlossen. Alle
weiteren Schritte liefen automatisch ab.

Sowohl für die Rohproteinbestimmungen mittels des kK-V als auch
mittels des KA-G wurden die Standardabweichungen (s) der
einzelnen Bestimmungen nach der Formel

$$s = \pm \sqrt{\frac{S_x}{n - 1}}$$

berechnet.

Hierbei bedeuten:

x = Werte für den Gehalt an Rohprotein
(Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

$\bar{x}$ = Mittelwert einer Untersuchungsreihe

$S_x = (x - \bar{x})^2$

n = Anzahl der Untersuchungen

γ) Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1

Rohproteingehalte ($N \times 6,25$) verschiedener Wurstproben,
ermittelt nach dem kK-V und mit dem KA-G

Probe	nach kK-V		mit KA-G	
		s		s
Gelbwurst	10,27	0,13	10,98	0,12
Wiener	10,72	0,22	11,26	0,12
Fleischwurst	12,70	0,12	12,70	0,12
Schinkenwurst	16,63	0,18	17,52	0,13
Leberwurst fein	9,19	0,20	9,74	0,17
Leberwurst grob	11,17	0,24	11,82	0,18
Blutwurst	8,75	0,48	9,96	0,30
Leberpressack	10,72	0,66	13,35	0,27
Cervelat	18,25	0,15	18,96	0,13
Pfeffersalami	17,33	0,22	17,83	0,18
Landjäger	18,20	0,52	18,73	0,33
Debreziner	13,83	0,46	14,36	0,38

Die durchschnittliche Standardabweichung (s) beträgt beim kK-V $\pm 0,29$, beim KA-G $\pm 0,21$.

Tab. 1 zeigt, daß die durchschnittliche Standardabweichung beim kK-V größer ist als beim KA-G.

Die Werte für Rohprotein bei feingekuttertem Material (Gelbwurst, Wiener, Fleischwurst) streuen allgemein erheblich weniger als diejenigen bei grobzerkleinertem (Landjäger, Leberpressack, Debreziner).

Die mittels des KA-G erhaltenen Rohproteinwerte liegen bei gleichem Probenmaterial und gleicher Probenaufbereitung immer etwas höher als die mittels des kK-V bestimmten.

Die Zerkleinerung des Untersuchungsmaterials mit dem Fleischwolf scheint für eine "Homogenisierung" des grobzerkleinerten Ausgangsmaterials (Debreziner, Landjäger, Leberpressack) nicht auszureichen. Deshalb ist auf Grund früherer Erfahrungen in einem Paralellansatz das Untersuchungsmaterial auch im ULTRA TURRAX (UT) zerkleinert worden.

b) Aufbereitung im ULTRA TURRAX

Für die Untersuchungen wurden jeweils 50 g der Proben im Fleischwolf mit einer 2 mm-Scheibe zerkleinert und anschließend mit Kohlensäureschnee versetzt. Das Gemisch wurde 30 Sek. im UT "homogenisiert".

α) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V

Von jeder Probe wurden 10 Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurden jeweils 2000 mg eingewogen.

β) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G

Von jeder Probe wurden 10 Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei jeweils 1000 mg in ein Spezialpapier eingewogen wurden.

Die Standardabweichungen (s) der Rohproteinbestimmungen wurden berechnet.

γ) Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tab. 2

Rohproteingehalte (N x 6,25) verschiedener Wurstproben,
ermittelt nach dem kK-V und mit dem KA-G

Probe	nach kK-V		mit KA-G	
		s		s
Gelbwurst	10,81	0,11	10,95	0,07
Wiener	11,16	0,18	11,58	0,08
Fleischwurst	13,13	0,10	13,03	0,08
Schinkenwurst	17,33	0,17	17,91	0,10
Leberwurst fein	9,85	0,18	10,01	0,09
Leberwurst grob	11,36	0,22	11,52	0,18
Blutwurst	8,95	0,30	10,17	0,07
Leberpressack	14,22	0,22	15,48	0,07
Cervelat	19,48	0,13	19,66	0,11
Pfeffersalami	20,35	0,21	20,52	0,18
Landjäger	19,31	0,39	19,33	0,18
Debreziner	15,49	0,24	15,71	0,19

Die durchschnittliche Standardabweichung (s) beträgt beim kK-V $\pm 0,24$, beim KA-G $\pm 0,11$.

Tab. 2 zeigt, daß die durchschnittliche Standardabweichung beim kK-V ($\pm 0,24$) wieder erheblich höher ist als diejenige beim KA-G ($\pm 0,11$) und zwar um die Hälfte.

Die Standardabweichungen der Rohproteinwerte aus Proben, die im UT zerkleinert worden waren, sind sowohl beim kK-V als auch beim KA-G wesentlich geringer als die für das im Wolf zerkleinerte Material.

Die ermittelten Rohproteinwerte der im UT zerkleinerten Untersuchungsproben liegen sowohl beim kK-V als auch beim KA-G im Vergleich zu den ermittelten Rohproteinwerten aus dem im Wolf zerkleinerten Material insgesamt höher, obwohl die Einwaage parallel erfolgt ist. Ich habe bisher keine Erklärung für diese Erscheinung.

Die mittels des KA-G erhaltenen Rohproteinwerte sind bei diesem "Homogenisierungsverfahren" nur noch geringfügig höher als die mittels des kK-V erhaltenen.

Obwohl die Streuung der ermittelten Rohproteingehalte durch das "Homogenisieren" im UT insgesamt verringert werden konnte, streuen in beiden Verfahren die Rohproteingehalte der grobzerkleinerten Untersuchungsproben mehr als die der feingekutterten Proben.

Die Streuung der Rohproteingehalte wird aufgrund der bisherigen Untersuchungsergebnisse von der "Homogenität" des Ausgangsmaterials beeinflusst.

Da mit den bisher geprüften Zerkleinerungsverfahren die Streuung der Rohproteinwerte bei grobzerkleinertem Ausgangsmaterial nicht voll befriedigend beeinflusst werden konnte, wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Gefriertrocknung als "Homogenisierungsverfahren" geprüft.

c) Aufbereitung durch Gefriertrocknung

Die Untersuchungen wurden mit grobzerkleinerten Rohwürsten (Debreziner, Landjäger und Pfeffersalami) durchgeführt.

Die Untersuchungsproben wurden mit dem Fleischwolf, 2 mm-Scheibe, zerkleinert und mit Kohlensäureschnee versetzt. Das Gemisch wurde 30 Sek. im UT "homogenisiert" und anschließend auf Bleche ($\varnothing$ 20 cm) ausgebreitet. Die Bleche wurden in die auf minus 40° C heruntergekühlte Gefriertrocknungsanlage verbracht. Nach abgeschlossener Trocknung wurde das Material in einer Mikromühle gemahlen.

α) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V

Von jeder Probe wurden je 10 Doppelbestimmungen durchgeführt. Jeweils genau 2000 mg wurden in Kjeldahl-Kolben eingewogen.

β) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G

Von jeder Probe wurden 10 Doppelbestimmungen mit einer Einwaage von je 500 mg durchgeführt.

Die Standardabweichungen (s) wurden für beide Verfahren berechnet.

γ) Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 3

Rohproteingehalte (N x 6,25) verschiedener Wurstproben,
ermittelt nach dem kK-V und mit dem KA-G

Probe	nach kK-V		mit KA-G	
		s		s
Debreziner	25,56	0,24	26,00	0,06
Pfeffersalami	25,91	0,21	26,13	0,04
Landjäger	27,72	0,22	28,13	0,07

Die durchschnittliche Standardabweichung (s) beträgt beim kK-V $\pm$ 0,22, beim KA-G $\pm$ 0,06.

Die ermittelten Standardabweichungen für die Rohproteingehalte liegen beim kK-V wesentlich höher als beim KA-G. Die Streuungen der Rohproteingehalte sind jedoch im Vergleich zu denen der Proben, die im Fleischwolf bzw. mit Hilfe des UT zerkleinert worden waren, geringer, vor allem die des KA-G.

Die Rohproteingehalte liegen bei den Proben, die im KA-G untersucht wurden wieder höher als bei den mittels des kK-V untersuchten.

II. Vergleichende Rohproteinbestimmungen von Fleischerzeugnissen mit hohen Fett- bzw. Bindegewebsgehalten mittels der konventionellen KJELDAHL-Methode und der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC

Der Aufschluß von Fleischerzeugnissen mit einem hohen Fett- und/oder hohen Bindegewebsanteil für die Rohproteinbestimmung mittels des konventionellen KJELDAHL-Verfahrens ist meist mit Schwierigkeiten verbunden. Werden die Anfangstemperaturen für den Aufschluß von Material mit einem hohen Fettanteil zu hoch gewählt, so beginnt das Material stark zu schäumen. Bei ungenügender Temperaturkontrolle kommt es dann zum Übersäumen des Aufschlußmaterials und damit zum Ausschluß des Untersuchungsansatzes. Zur Verhinderung des übermäßigen Schäumens muß deshalb eine schaumhemmende Substanz (z.B. Stearinsäure, Silicon) zugesetzt werden.

Werden zum anderen die für den Fettaufschluß optimalen Temperaturen nicht erreicht, so erfolgt kein vollständiger Aufschluß, die Lösung bleibt schwarz. Dieser mangelhafte Aufschluß kann auch durch erhöhte Schwefelsäurezugabe nicht beeinflusst werden.

Ähnlich schwierig ist der Aufschluß von Material mit hohem Bindegewebsanteil. Oft werden die für den Aufschluß optimalen Temperaturen nicht erreicht, und die Lösung bleibt dann auch nach Verlängerung der Aufschlußzeit schwarz. Es sollte deshalb im Vergleich mit dem kK-V das KA-G geprüft werden, ob das zur Untersuchung verwendete Material vollständig aufgeschlossen wird und ein Übersäumen zu beobachten ist.

1. Material und seine Aufbereitung

Für die Untersuchung wurden geräucherter Speck, zwei Schmalzfleischerzeugnisse, Deutsches Corned beef und rohe Schwarten verwendet.

Die Proben wurden im Fleischwolf, 4,5 mm-Scheibe, zerkleinert, mit Kohlensäureschnee versetzt und im UT 30 Sek. "homogenisiert".

a) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V

Für die Rohproteinbestimmung wurden jeweils 10 Doppelbestimmungen angesetzt. Jeweils 2000 mg wurden in Kjeldahl-Kolben eingewogen.

b) Rohproteinbestimmung mittels des KA-G

Für die Rohproteinbestimmungen von jeweils 10 Doppelproben wurden 1000 mg in ein "stickstofffreies" Papier eingewogen.

c) Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4

Rohproteingehalte ($N \times 6,25$) der Proben, ermittelt nach dem kK-V und mit dem KA-G

Probe	nach kK-V	s	mit KA-G	s
Speck geräuchert	1,82	0,24	1,96	0,11
Schmalzfleisch	7,89	0,18	8,17	0,14
Schmalzfleisch	15,12	0,33	15,40	0,30
Dt. Corned beef	18,15	0,28	19,02	0,24
Swarten roh	32,72	0,34	33,47	0,28 ($N \times 5,55$)

Die durchschnittliche Standardabweichung beträgt beim kK-V $\pm 0,27$, beim KA-G $\pm 0,21$.

Wie Tab. 4 zeigt, ist die durchschnittliche Streuung der Rohproteingehalte beim kK-V wieder größer als beim KA-G.

Die mittels des KA-G erhaltenen Rohproteinwerte liegen erneut etwas höher als die im kK-V erhaltenen. Der Aufschluß sowohl von Material mit einem hohen Fettanteil (geräucherter Speck, Schmalzfleisch) als auch von Material mit hohem Bindegewebsanteil (rohe Schwarten, Deutsches Corned beef) erfolgte im KA-G offenbar vollständiger.

III. Vergleichende Rohproteinbestimmungen von verschiedenem stickstoffhaltigen Untersuchungsmaterial mittels der konventionellen KJELDAHL-Methode und der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC

Im Rahmen dieser Untersuchungsreihe wurde geprüft, ob die Stickstoffbestimmung mittels des KA-G nicht nur in Lebensmitteln tierischer Herkunft, sondern auch von anderen stickstoffhaltigen Substanzen zufriedenstellend geführt werden kann.

1. Material

Untersucht wurden Futtermittel (Heu, "Kälbernährmilch", Milchaustauscher, Milchviehfutter, Magermilch, Milchpulver und Fischmehl) außerdem Gerste, Weizen und Malz sowie Kotproben und Panseninhalt von Rehen; Proben, um deren Untersuchung wir im Rahmen von Dienstleistungen ohnehin gebeten worden waren.

a) Rohproteinbestimmung mittels des kK-V

Für die Rohproteinbestimmungen wurden vom o.a. Material jeweils 2000 mg in Kjeldahl-Kolben eingewogen.

b) Rohproteinbestimmungen mittels des KA-G

Von dem Material wurden jeweils 1000 mg für den Aufschluß eingewogen.

c) Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse der Rohproteinbestimmungen sind

vergleichend in Tab. 5 zusammengefaßt. Die angegebenen Rohproteinwerte sind das Mittel aus jeweils 8 Probenansätzen.

Tab. 5

Vergleichende Rohproteinbestimmungen mittels des kK-V
und des KA-G,

Probe	nach kK-V	mit KA-G
Gerste u. Malz, Gemisch I	9,40	9,70
Gerste u. Malz, Gemisch II	13,25	13,90
Gerste u. Malz, Gemisch III	10,33	10,65
Gerste I	13,12	13,26
Gerste II	9,31	9,34
Gerste III	10,22	10,76
Weizen	13,81	13,91
Heu	10,25	10,57
Mischfutter I	17,86	20,85
Mischfutter II	31,24	33,42
Mischfutter III	11,33	12,45
Mischfutter IV	17,92	18,22
Milchviehfutter	41,81	42,02
Kälbernährmilch	23,86	24,11
Milchaustauscher	24,83	25,32
Magermilchpulver I	35,31	35,35
Magermilchpulver II	35,42	35,62
Milchpulver I	25,04	25,51
Milchpulver II	22,05	22,55
Fischmehl	61,94	61,72
Rehkot	24,24	24,34
Panseninhalt, Reh	26,23	26,43

Die Rohproteingehalte lagen bei nahezu allen mittels des KA-G untersuchten Proben wieder etwas höher.

IV. Untersuchungen zur Sicherung der mittels der KJEL-FOSS
MACRO-AUTOMATIC bestimmten Rohproteingehalte

In der Bedienungsanleitung zur KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC wird für die Eingabe der Proben ein Gewicht von 500 bzw. 1000 mg angegeben. Wenn der geschätzte Rohproteingehalt ($N \times 6,25$) weniger als 45% oder der Stickstoffgehalt entsprechend weniger als 7% beträgt, sollen von der Probe jeweils 1000 ± 2 mg eingewogen werden. Wenn der Stickstoffgehalt

möglicherweise über 7% liegt, empfiehlt sich von vornherein eine Einwaage von nur 500 ± 1 mg, da die Titration bei einem Probengewicht von 1000 mg mit hohem Stickstoffgehalt u.U. nicht beendet wird und dann ein neuer Ansatz notwendig wird. Es wurde geprüft, inwieweit durch die Einwaagengrößen 500, 1000 sowie 2000 mg von Fleischerzeugnissen die Meßwerte für Rohprotein beeinflußt werden.

1. Prüfung der Meßwerte für Rohprotein in Abhängigkeit von der Probeneinwaage bei Fleischerzeugnissen

a) Material und seine Aufbereitung

Für die Untersuchungen wurden Brühwürste (Fleischwurst, Bierwurst), Kochwürste (Blutwurst, Thüringer Rotwurst, Leberpressack) und Rohwürste (Landjäger, grobe Mettwurst, Salami, Schlackwurst) sowie geräucherter Speck verwendet.

Die Proben wurden im Fleischwolf, 2 mm-Scheibe, zerkleinert, mit Kohlensäureschnee versetzt und 30 Sek. im UT "homogenisiert".

Von den Proben wurden jeweils 500 ± 1 , 1000 ± 2 sowie 2000 ± 2 mg eingewogen.

Von jeder Probe wurden je 10 Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte ($\bar{x}$) sowie die Standardabweichungen (s) errechnet.

b) Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Tab. 6

Rohproteingehalte (N x 6,25) verschiedener Wurstproben,
mittels des KA-G bestimmt, bei Einwaagen von 500, 1000
sowie 2000 mg

Probe	500 mg		1000 mg		2000 mg	
		s		s		s
Fleischwurst	14,55	0,27	14,53	0,08	14,35	0,28
Bierwurst	17,10	0,20	16,73	0,09	16,71	0,28
Leberpressack	15,68	0,12	15,48	0,07	-	-
Blutwurst	9,90	0,08	10,17	0,07	-	-
Thür. Rotwurst	17,59	0,23	17,97	0,19	17,71	0,33
Schlackwurst	19,82	0,10	20,00	0,08	19,92	0,30
Salami	21,17	0,23	21,60	0,17	-	-
Mettwurst grob	17,09	0,19	17,00	0,18	16,93	0,27
Landjäger	23,36	0,41	23,35	0,22	-	-
Speck geräuchert	1,72	0,22	1,46	0,08	-	-

Die durchschnittliche Standardabweichung (s) für die Rohproteinbestimmung bei einer Probeneinwaage von 500 mg beträgt $\pm 0,21$, bei einer Probeneinwaage von 1000 mg $\pm 0,12$. Wurden je 2000 mg des Untersuchungsmaterials eingewogen, lagen die ermittelten Werte für Rohprotein bei den Mehrfachbestimmungen weit auseinander, weil vielfach entweder der Aufschluß nicht abgeschlossen (Aufschlußlösung schwarz) oder die Titration nicht beendet war.

Die Anzeige der Meßwerte ist beim KA-G digital auf 3 Ziffern als % N oder als % N x f möglich, wobei f als Faktor mit 6,37; 6,25; 5,7 oder eigens auf einen speziellen Wert vorgewählt werden kann (vom Kundendienst der Firma!). Die Digitalanzeige wird dabei direkt durch die Kolbenbewegung der Bürette der Titrationslösung (H_2SO_4) über ein Potentiometer und einen Verstärker gesteuert.

Da jedoch oftmals die Art der zu messenden Probe ein genaues Abwiegen unmöglich macht, zumindest aber sehr erschwert, empfiehlt der Hersteller des KA-G das willkürliche Gewicht nahe an 500 oder 1000 mg zu wählen und das Ergebnis nach folgender Gleichung zu korrigieren:

$$\text{Tatsächliches Ergebnis} = \frac{\text{Anzeige} \times 500 \text{ (1000)}}{\text{tatsächliche Einwaage}}$$

Die Berechnung der Rohproteingehalte über den Stickstoffgehalt wird in dem KA-G bei Proben mit einer Einwaage von 500 mg auf eine Dezimalstelle, bei Proben mit 1000 mg Einwaage und einem

Stickstoffgehalt unter 1,6 bzw. Rohproteingehalt unter 10% auf zwei Dezimalstellen und bei einem Rohproteingehalt über 10 % auf eine Dezimalstelle genau angezeigt.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte deshalb geprüft werden, in welcher Höhe die Einwaagen differieren können, ohne daß dadurch die Genauigkeit der Meßwerte beeinträchtigt wird.

2. Auswirkung der Einwaagengenauigkeit auf die Meßwerte im KA-G

Um den Einfluß der Einwaagenschwankungen auf die Meßwerte für Stickstoff bzw. Rohprotein besser beurteilen zu können, wurde für die Untersuchungen eine Substanz mit definiertem Stickstoffgehalt gewählt.

a) Material

Die Untersuchungen wurden mit Phenylalanin^{x)} durchgeführt. Der Stickstoffgehalt, aus dem Molekulargewicht berechnet, beträgt 8,49 %.

Für 10 Bestimmungen wurde als Einwaage ein willkürliches Gewicht nahe an 500 mg gewählt. Die Einwaagen lagen im Bereich von 490 bis 505 mg.

Von den Proben wurden sowohl die Meßwerte von Stickstoff als auch für Rohprotein ($N \times 6,25$) notiert.

b) Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

^{x)} Fa. Merck

Tab. 7

Meßwerte für Stickstoff und Rohprotein (N x 6,25) von
Phenylalanin bei willkürlicher Gewichtswahl nahe 500 mg

Einwaage in mg	N %	N x 6,25 %
490,13	8,5	52,6
494,05	8,5	53,1
495,55	8,6	53,1
495,91	8,6	53,3
496,83	8,6	53,3
497,33	8,6	53,4
498,70	8,6	53,6
499,62	8,6	53,6
500,00	8,6	53,6
505,14	8,7	53,9

Die Ergebnisse aus Tab. 7 zeigen, daß bei einer Einwaage ab 495,55 bis zu 500,00 mg Phenylalanin stets die gleichen (offenbar aufgerundeten) Meßwerte für Stickstoff erhalten werden, während die Angaben für Rohprotein (N x 6,25) von 53,1 bis 53,6% schwanken. Paradoxerweise ist der multiplizierte Wert genauer. Dies hängt damit zusammen, daß bei der N x 6,25 - Angabe offenbar hundertstel direkt respektiert und nicht auf- oder abgerundet werden.

Mit Lösungen bekannter Rohproteinkonzentration (N x 6,25) (Lösung I 0,5%, Lösung II 39,7%) wird die Meßwertanzeige (Digitalanzeige) des KA-G jeweils vor den Untersuchungen auf die " theoretischen Sollwerte" geeicht. Dieser Vorgang entspricht praktisch einer Titereinstellung der Säure. Ein möglicher, geringer Stickstoffgehalt der Reagentien wird somit durch die Korrektur der Digitalanzeige auf den "theoretischen Sollwert" kompensiert.

Da es nicht sicher erschienen war, daß durch die Eichung des Gerätes mit Lösungen einer definierten Stickstoffverbindung, nämlich Ammoniumsulfat alle Stickstoffverbindungen erfaßt werden, wurde geprüft, ob der in den Stickstoffverbindungen unterschiedlich gebundene Stickstoff gleichermaßen wiedergefunden wird.

3. Stickstoffbestimmung in Substanzen mit definiertem Stickstoffgehalt mittels des KA-G

a) Material

Für die Untersuchungen wurden Aminosäuren (aliphatische: Cystin, Valin; aromatische: Phenylalanin; heterocyclische: Prolin, Hydroxyprolin, Tryptophan), Harnstoff, Acetanilid sowie Nicotinsäureamid verwendet.

Von den Substanzen wurden jeweils genau 500 mg für den Aufschluß eingewogen.

b) Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Tab. 8

Stickstoffgehalte mittels des KA-G bestimmt im Vergleich zu den definierten Stickstoffgehalten der Substanzen

Probe	% N gemessen	% N theoretisch
Cystin	11,7	11,66
Valin	12,0	11,96
Phenylalanin	8,58	8,49
Prolin	12,3	12,17
Hydroxyprolin	10,8	10,69
Tryptophan	13,6	13,72
Harnstoff	46,7	46,64
Acetanilid	10,4	10,4
Nicotinsäureamid	22,7	22,9

Wie aus den in Tab. 8 zusammengefaßten Ergebnissen ersichtlich ist, ergeben sich beim Vergleich zwischen den gemessenen und den theoretischen Stickstoffgehalten nur geringfügige, nicht signifikante Abweichungen.

Für die Prüfung des KA-G auf seine Eignung zur Rohproteinbestimmung in Fleischerzeugnissen galt es noch abzuklären, inwieweit die Meßwerte reproduzierbar sind.

4. Reproduzierbarkeit der mittels des KA-G erhaltenen Meßwerte für Rohprotein

a) Material und seine Aufbereitung

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Meßwerte wurden Brühwurstchargen nach folgender Grundrezeptur hergestellt, die zugleich Charge 1 (Kontrollcharge) war:

40% Rindfleisch	15 g Nitritpökelsalz
35% Speck	4 g Gewürz /kg Brät
25% Eis	1 g Natriumascorbat /kg Brät

Den weiteren Chargen (2 - 9) wurden im einzelnen pro kg Fleisch und Speck in der Reihenfolge 15 g Sojaprotein, 15 g aufgeschlossenes Milcheiweiß, 15 g Sojamehl, 22,5 g flüssiges Hühnereieiweiß, 15 g Trockenblutplasma, 15 g Plasmaeiweiß, 15 g Milchpulver sowie 15 g Weizenkleber zugesetzt.

Die Chargen wurden 45 Min. bei 60° C, anschließend 60 Min. bei 80° C erhitzt.

Für die Untersuchung wurden die feingekutterten Chargen zweimal im Fleischwolf mit einer 2 mm-Scheibe zerkleinert und jeweils genau 1000 mg eingewogen.

Von jeder Charge wurden 20 Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte ($\bar{x}$) sowie die Standardabweichungen (s) berechnet.

b. Ergebnisse

Die Mittelwerte ($\bar{x}$) aus 20 Bestimmungen (n = 20) sowie die Standardabweichungen (s) der untersuchten Chargen sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Tab. 9

Mittelwerte ($\bar{x}$) der Rohproteingehalte (n = 20) und
Standardabweichungen (s)

Probe		s
Charge 1	9,7	0,09
Charge 2	11,3	0,12
Charge 3	10,9	0,10
Charge 4	10,9	0,10
Charge 5	10,0	0,08
Charge 6	10,7	0,10
Charge 7	10,7	0,17
Charge 8	10,9	0,13
Charge 9	11,3	0,22

c) Berechnung der Reproduzierbarkeit

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit wurde zunächst die Verteilung der Untersuchungsergebnisse (Rohproteingehalte der einzelnen Chargen) graphisch dargestellt (Abb. 1).

Auf der Ordinate des Koordinatenkreuzes wurde die Anzahl der Fälle (Treffer) und auf der Abszisse der Rohproteingehalt in % aufgetragen. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen wurden errechnet.

Aus den ermittelten Rohproteinwerten läßt sich eine gemeinsame Kurve (Normalverteilungskurve) erstellen. Dabei wird auf die Angabe der Rohproteingehalte verzichtet und lediglich die Abweichung vom Mittelwert ($\bar{x}$) berücksichtigt. Die Normalverteilung ist in Abb. 2 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Fälle, auf der Abszisse die Abweichungen der einzelnen Rohproteinwerte vom Mittelwert aufgetragen. Wie Abb. 2 zeigt, weichen die ermittelten Rohproteinwerte nur geringfügig von der Normalverteilungskurve ab.

Aus den Abweichungen von der Normalverteilungskurve wurde mit Hilfe des χ^2 -Tests die Fehlerwahrscheinlichkeit nach der Formel

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(m_i - nP_i)^2}{nP_i}$$

errechnet.

Hierbei bedeutet: m_1 = beobachtete Zahlen

nP_1 = theoretische Werte

Für $\chi^2 = 1,934$ ergibt sich bei einem Freiheitsgrad von $k' = 8$ eine Wahrscheinlichkeit von 0,9826. Die Wahrscheinlichkeit für ein reproduzierbares Ergebnis beträgt bei dieser Untersuchung 98,26%.

Abb. 1

"Verteilung" der ermittelten Meßwerte für die Rohprotein-
gehalte der untersuchten Chargen, $n = 20$

Anzahl

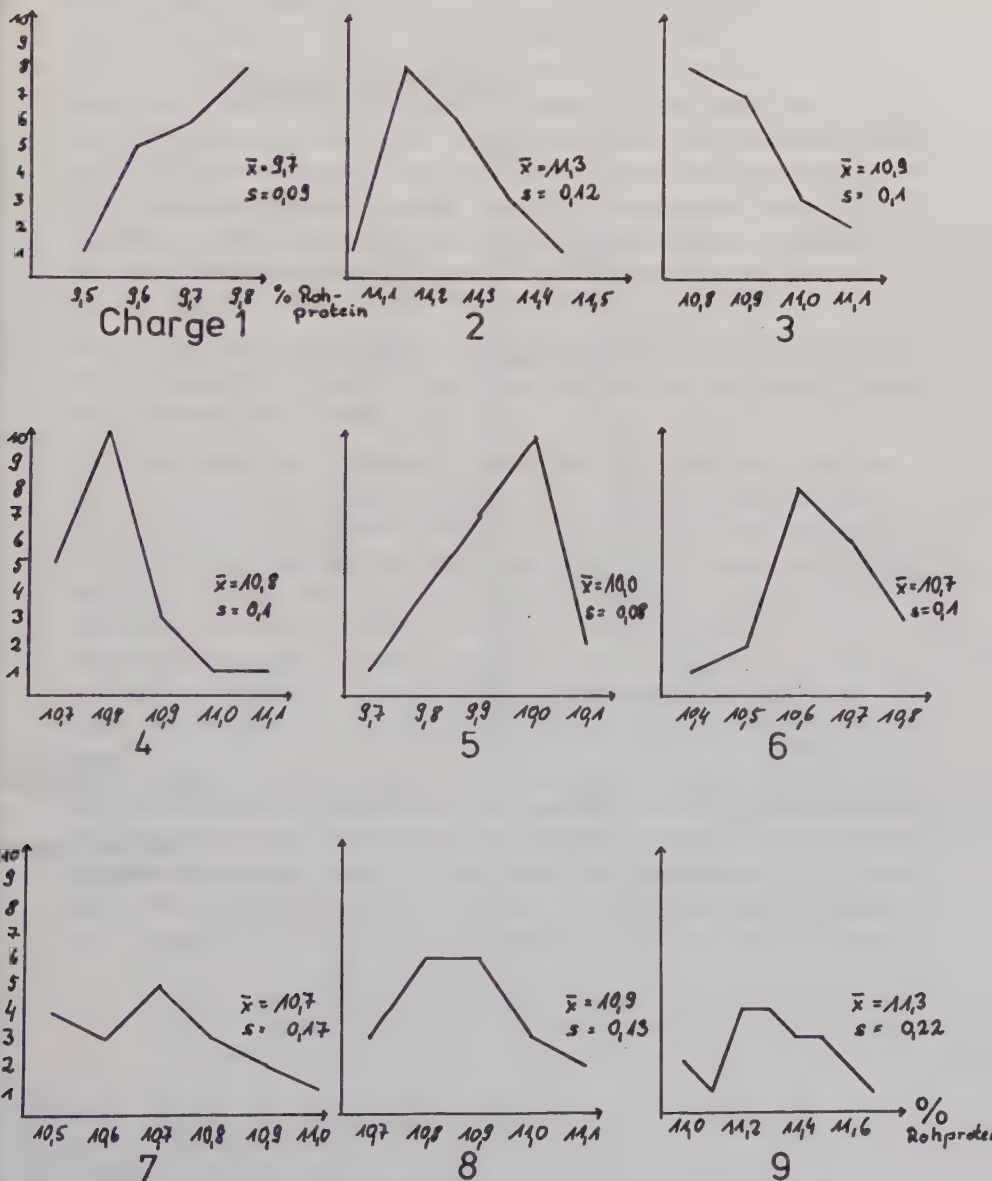
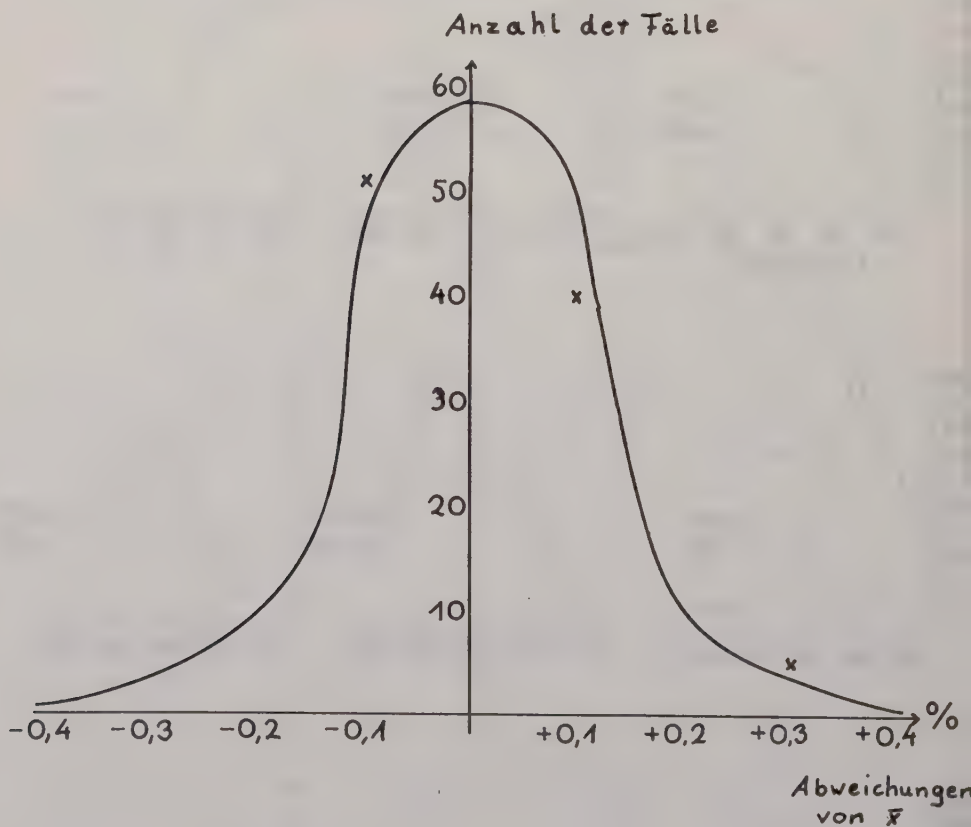


Abb. 2

Normalverteilungskurve, ermittelt aus den Abweichungen der Rohproteingehalte vom Mittelwert ($\bar{x}$), $n = 180$



D. DISKUSSION

Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes von Fleischerzeugnissen mit der Methode nach KJELDAHL wird z.Zt. in erster Linie noch konventionell durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial wird dabei unter Verwendung eines geeigneten Katalysators (Selenreaktionsgemisch) mit konzentrierter Schwefelsäure auf einer Heizquelle aufgeschlossen. Die Aufschlußzeit schwankt in Abhängigkeit vom aufzuschließenden Material und dem verwendeten Katalysator um bis zu 3 Std.. Nach Abkühlen und Verdünnen der klaren Aufschlußlösung erfolgen Destillation und Titration. Die Destillation kann in dem Destillationsapparat nach BÜCHI mit Hilfe eines Dampfgenerators auf 4 Min. verkürzt werden. Im Gerät nach PARNAS-WAGNER dauert die Destillation dagegen ca. 1/2 Std..

Die steigenden Ansprüche an die Sicherheit der KJELDAHL-Methode in Serienanalysen führten zur Entwicklung von Analysenautomaten zur Stickstoffbestimmung.

Der Analysenautomat "BRAUN-Systematik" (1) führt die Arbeitsabschnitte Destillation und Titration bei der Stickstoffbestimmung zwar automatisch durch, und die bei diesen Arbeitsabschnitten in der konventionellen KJELDAHL-Methode auftretenden subjektiven Einflußgrößen werden ausgeschlossen, der Aufschluß des Probenmaterials erfolgt jedoch nach der Arbeitsweise der konventionellen KJELDAHL-Methode. Hierbei ist für einen optimalen Aufschluß die Wahl des Aufschlußmittels und eine konstante Temperaturführung sowie die Zeitdauer recht bedeutsam.

Von der Firma FOSS ELECTRIC wurde Anfang 1974 in Deutschland ein Analysenautomat angeboten, in dem die Methode nach KJELDAHL vom Aufschluß der Probe bis zum fertigen Meßergebnis in 6 Teilschritten innerhalb von 12 - 15 Min. durchgeführt wird und in Serie dann alle 3 Min. ein Meßergebnis abgelesen werden kann.

Da die Bestimmung der Stickstoffsubstanzen nach KJELDAHL Bestandteil der Routineuntersuchungen von Lebensmitteln tierischer Herkunft ist, wurde geprüft, ob sich das Gerät KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC für die Bestimmung der Rohprotein-gehalte in Fleischerzeugnissen eignet.

Um die Genauigkeit der Stickstoffbestimmungen mittels des KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC-Gerätes (KA-G) zu überprüfen, wurden Fleischerzeugnisse sowohl mittels des konventionellen KJELDAHL-Verfahrens (kK-V) als auch mittels der genannten Anlage untersucht.

Für die Bestimmung wurde ein Teil der untersuchten Fleisch-erzeugnisse zweimal mit dem Fleischwolf (2 mm-Scheibe) zer-kleinert, ein anderer Teil nach der Grobzerkleinerung mittels Fleischwolf im ULTRA-TURRAX.

Sowohl bei dem mit dem Fleischwolf als auch bei dem im UT zer-kleinerten Untersuchungsmaterial streuten die mittels des kK-V erhaltenen Rohproteinwerte stärker als die im KA-G bestimmten (Tabb.1 und 2).

Die bereits von THALACKER (39) getroffene Feststellung, daß aufgrund des kleineren Streubereiches der Rohproteingehalte bei feingekuttertem Ausgangsmaterial dem Faktor " Schwankungen des Rohproteingehaltes innerhalb einer Charge" keine Bedeutung zukommt, konnte bestätigt werden.

Obwohl durch Zerkleinerung der Untersuchungsproben im UT gegen-über den im Fleischwolf zerkleinerten Proben die Streuung der Rohproteinwerte insgesamt verringert werden konnte, streuten die Rohproteinwerte des feingekutterten (Gelbwurst, Wiener, Fleischwurst) gegenüber den Rohproteinwerten des grobzerkleinerten Ausgangsmaterials (Pfeffersalami, Landjäger, Debreziner) wesentlich geringer.

Da die Streuung der Rohproteingehalte des grobzerkleinerten Ausgangsmaterials auch bei den mittels des KA-G untersuchten Proben größer war als die der Proben aus feinzerkleinertem Ausgangsmaterial, konnte sie nicht nur auf das, erwartungs-gemäß beim kK-V wegen der größeren Anzahl von subjektiven

Einflußgrößen, signifikant größere Streumaß, zurückgeführt werden. Durch den Einsatz der Gefriertrocknung als weiteres "Homogenisierungsverfahren" für das grobzerkleinerte Ausgangsmaterial konnte die Streuung der Rohproteinwerte bei der Bestimmung im KA-G wesentlich verringert werden (Tab. 3). Die Streuung der mittels des KA-G erhaltenen Rohproteinwerte war dabei so gering, daß ihr m.E. keine Bedeutung zukommt.

Von der Zusammensetzung der Substanzen hängt der Verbrauch von Schwefelsäure für den Aufschluß ab. HADORN und OBRIST (14) stellten fest, daß die Menge der Schwefelsäure im Wesentlichen vom Fettgehalt der Probe abhängt.

Die Hersteller machen hinsichtlich der notwendigen Schwefelsäuremengen folgende Angaben: 1 g Protein verbraucht 4,9 ml konz. Schwefelsäure und 1 g Fett 9,7 ml. Durch die Gegenwart von H_2O_2 wird der Verbrauch erheblich verringert. Wie die Untersuchungsergebnisse (Tab. 4) zeigen, konnten die vom Hersteller der Anlage für bestimmte Fettgehalte empfohlenen Einstellungen des Gerätes bestätigt werden. Der Aufschluß von Material mit hohem Fettanteil erfolgte vollständig.

Die im KA-G ermittelten Rohproteinwerte für geräucherten Speck und zwei Proben Schmalzfleisch lagen über denen der im kK-V ermittelten.

Die Zugabe von schaumhemmenden Substanzen (Stearinsäure, Silicon) war nicht erforderlich.

Die durch die Verwendung des WILLITS-Katalysators (KJEL-TABS) erfolgte Siedepunktserhöhung reicht auch für den vollständigen Aufschluß von Material mit einem hohen Bindegewebsgehalt (Deutsches Corned beef, Schwarten roh) aus. Die ermittelten Rohproteinwerte lagen im KA-G höher als die nach dem kK-V bestimmten (Tab. 4).

Die Untersuchungen zur Sicherung der mittels des KA-G bestimmten Rohproteingehalte bestätigen die vom Hersteller publizierten Angaben.

Nur bei einer Probeneinwaage von 500 mg bei Erzeugnissen deren Stickstoffgehalt möglicherweise über 7% liegt und von 1000 mg bei Erzeugnissen, deren Stickstoffgehalt geringer als 7% ist, erfolgt ein vollständiger Aufschluß des Untersuchungsmaterials.

Wie die in Tab. 6 zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse zeigen, erfolgte bei Probeneinwaagen von 2000 mg der Aufschluß des Materials nur ungenügend oder die Titration war in der programmierten Zeit nicht abgeschlossen.

Da häufig die Art der zu messenden Probe ein genaues Einstellen auf ein Standardgewicht verhindert, sollte dann wenn das Gewicht der Probe um mehr als 2,5 mg von der gewählten Einwaage (500 bzw. 1000 mg) abweicht, eine Umrechnung erfolgen.

Die in Tab. 7 zusammengefaßten Ergebnisse verdeutlichen, daß bei einer Einwaage von 495,55 bis 500,00 mg stets die gleichen Meßwerte für Stickstoff (8,6), für Rohprotein jedoch die Werte 53,1 bis 53,6 erhalten werden, offenbar weil die N-Werte hierbei nicht auf- oder abgerundet worden sind.

Obwohl bei der Eichung des Gerätes mit Lösungen bekannter Mengen von Ammoniumsalzen ein möglicher, geringer Stickstoffgehalt der Reagentien korrigiert wird, ist nicht sichergestellt, daß bei sehr unterschiedlichem Probenmaterial der gesamte Stickstoff beim Aufschluß erfaßt wird.

Nach MONTAG (25) werden mit Hilfe des KA-G nicht nur der peptidartig gebundene Stickstoff und freie Amino- und Imino-gruppen vollständig erfaßt, sondern auch der Stickstoff heterocyclischer Verbindungen.

Die Ergebnisse aus Tab. 8 zeigen, daß auch bei eigenen Untersuchungen der Stickstoff heterocyclischer Verbindungen vollständig erfaßt wird.

Die in zwei Fällen geringgradigen, wenn auch nicht signifikanten Abweichungen der Meßwerte (Tryptophan: gemessen 13,6; theoretisch 13,72; Nicotinsäureamid: gemessen 22,7; theoretisch 22,9) von den theoretischen Daten wären sicherlich durch zusätzliche Wiederholungsmessungen kleiner geworden.

Bei der Bestimmung der Rohproteingehalte von Modellchargen hat die Wahrscheinlichkeit für ein reproduzierbares Ergebnis 98,26% betragen.

Die Eignung der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC zur Rohproteinbestimmung in Lebensmitteln tierischer Herkunft konnte bestätigt werden. Alle untersuchten stickstoffhaltigen Produkte konnten erfaßt werden. Die dem konventionellen KJELDAHL-Verfahren vorgehaltenen subjektiven Einflüsse werden reduziert.

Die Vorzüge des Automaten (20 Meßwerte je Std., geringer Platzbedarf, keine Reinigung von Glasgeräten, Reduzierung des Engagements von ausgebildetem Laborpersonal) können dazu führen, daß die Intensität der Lebensmitteluntersuchungen nicht durch beschränkte Möglichkeiten zur Stickstoff- bzw. Rohproteinbestimmung eingeengt ist.

Die Anlage kann zwar in jedem Raum, der Wasser- und Stromversorgung enthält, aufgestellt werden, eine Abzugseinrichtung, zumindest aber eine Entlüftungsanlage besonders bei großen Serienuntersuchungen sollte jedoch vorhanden sein.

Die während der etwa 6000 Analysen, die im Laufe der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, auftretenden Störungen konnten, sofern sie nur auf Bedienungsfehler (schlecht entlüftetes Schlauchsystem, fehlerhafter Gas- und Wasserdruck) und Materialverschleiß (Schlauchsystem, Glas) zurückzuführen waren, selbst behoben werden. Bei vereinzelt Störungen in der Elektronik mußte der Kundendienst herangezogen werden.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Literatur über die Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL wird besprochen.
2. In vergleichenden Bestimmungen der Stickstoff- bzw. Rohproteingehalte in Fleischerzeugnissen mittels des konventionellen KJELDAHL-Verfahrens und der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC war die Eignung der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC zu bestätigen.
3. Streuungen der Rohproteinwerte hängen praktisch nur von der "Homogenität" des Untersuchungsmaterials ab.
4. Die Standardabweichungen der mittels des KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC-Gerätes ermittelten Rohproteinwerte waren geringer als die beim konventionellen KJELDAHL-Verfahren erhaltenen.
5. Die Wahrscheinlichkeit für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in der KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC liegt bei 98,26%.
6. Alle stickstoffhaltigen Produkte, auch solche mit heterocyclischen Verbindungen, können im KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC-Gerät gemessen werden.

E. S U M M A R Y

1. The literature concerning the determination of nitrogen by the KJELDAHL-method is discussed.
2. By comparison of the determination of nitrogen respectively protein in meat products by means of the conventional KJELDAHL-method and the KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC the suitability of the KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC could be attested.
3. The extent of deviation of the protein contents depends on the "homogeneity" of the material.
4. The standard deviation of the protein contents found out by means of the KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC was less than that found out by means of the conventional KJELDAHL-method.
5. The probability of the reproducibility of the results amounts to 98,26 % by means of the KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC.
6. All products containing nitrogen, even nitrogen in heterocyclic compounds, can be determined by means of the KJEL-FOSS MACRO-AUTOMATIC.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Arneth, W.: Eine Methode zur halbautomatischen Bestimmung des Hydroxyprolin- und Gesamteiweißgehaltes in Fleisch und Fleischwaren. Fleischwirtschaft 54 (1974), 85
2. Assoc. Offic. Agr. Chem.: Methods of Analysis. 9th ed. (1960), 12
3. Baker, P.R.W.: Micro-Kjeldahl Determination of Nitrogen. The Effects of Added Salts and Catalysts. Talanta 8 (1961), 57
4. Beet, A.E.: Further Experiments with the Kjeldahl Process. A Comparison Between Coal and Other Nitrogenous Substances. Fuel 11 (1932), 406
5. Beet, A.E.: Potassium Permanganate in the Kjeldahl Method for Determining Nitrogen in Organic Substances. Nature 175 (1955), 513
6. Bradley, J.A.: Kjeldahl Distillation without Absorbing Acid. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 14 (1942), 705
7. Bradstreet, R.B.: Acid Requirement of the Kjeldahl Digestion. Anal. Chem. 29 (1957), 944
8. Bradstreet, R.B.: The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. Acad. Press, New York, London 1965, 42
9. Carpiaux, E.: Source of Error in the Kjeldahl-Gunning Method for the Determination of Nitrogen. Bull. soc. chim. Belges 27 (1914), 13
10. Chand, R.: Kjeldahl distillation in a Closed Still. J. Indian Chem. Soc. 24 (1947), 167
11. Davidson, J., J. Mathieson and A.W. Boyne: The Use of Automation in Determining Nitrogen by the Kjeldahl Method, with Final Calculations by Computer. Analyst 95 (1970), 181

12. Flamand, A. and B. Prager: Analysis of Compounds Containing -N-N- Bonds by the Kjeldahl Method. Ber. 38 (1905), 559
13. Gunning, J.W.: Z. anal. Chem. 28 (1889), 188
zitiert nach Bradstreet (8)
14. Hadorn, H. und Ch. Obrist: Systematische Versuche mit verschiedenen Katalysatoren für den Kjeldahlaußschluß.
Dt. Lebensmittel-Rdsch. 69 (1973), 109
15. Kjeldahl, J.: Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern.
Z. anal. Chem. 22 (1883), 366
16. Kleeman, R.: The Effect of Hydrogen Peroxide Upon the Decomposition of Plant and Animal Substances.
Z. angew. Chem. 34 (1921), 625
17. Kuznezov, V.I.: Determination of Nitrogen in Azo Compounds by the Kjeldahl Method.
Zavodskaja Lab. 2 (1940), 1039
18. Lauro, M.F.: Use of Selenium as Catalyst in the Determination of Nitrogen by the Kjeldahl Method.
Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 3 (1931), 401
19. McKenzie, H.A. and H. S. Wallace: The Kjeldahl Determination of Nitrogen: A Critical Study of Digestion Conditions - Temperature, Catalyst, and Oxidizing Agent.
Australian J. Chem. 7 (1954), 55
20. Meyer, I. und C. Geissler: Vergleichende Untersuchungen an NH₃-Destillationsapparaturen bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.
Die Nahrung 17 (1973), 507
21. Middleton, G. and R. E. Stuckey: Standardization of Digestion in Kjeldahl Nitrogen Determinations.
J. Pharm. and Pharmacol. 3 (1951), 829

22. Milbauer, J.: Reactions in Concentrated Sulfuric Acid.
VI. The Relation of the Substance to be
Oxidized to the Effectiveness of the Catalyst.
Chem. obzor. 11 (1936), 208
23. Milbauer, J.: Modification of the Kjeldahl Procedure.
Z. Anal. Chem. 111 (1938), 397
24. Miller, L. and J. A. Houghton: Micro-Kjeldahl Determination
of the Nitrogen Content of Amino Acids and
Proteins.
J. Biol. Chem. 159 (1945), 373
25. Montag, A.: Stickstoffbestimmung nach der Kjeldahl-Methode
im Kjel-Foss-Automatic-Gerät.
Gordian 74 (1974), 203
26. Oberrieth, R. and N. H. Mermelstein: Instrument Automates,
Accelerates Nitrogen Determinations.
Food Technology 28 (1974), 40
27. Ogg, C.L., R.W. Brand and C.O. Willits: Micro and Semi-Micro
Determination of Nitrogen in Heterocyclic
Nitrogen Ring Compounds by a Kjeldahl Method.
J. Assoc. Offic. Agr. Chemists. 31 (1948), 663
28. Phelps, I.K.: The Use of Permanganate in the Kjeldahl Method
Modified for Nitrites.
J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 4 (1920), 69
29. Rubio Pacheco, J. de la, F.B. Lopez - Rubio and
J. Garrido Marquez: The Kjeldahl Method in
Agricultural Analysis.
Inform. Quim. Anal. (Madrid) 4 (1950), 166
30. Salkowski, E.: Physiological Chemical Notes. IV. Notes on
Kjeldahl Determinations.
Z. Physiol. Chem. 57 (1907), 523
31. Schmidhofer, Th., H.-R. Egli und R. Weber: Zur chemischen
Untersuchung von Fleisch und Fleischwaren mit
dem "Technicon-AutoAnalyser".
Alimenta 12 (1973), 109

32. Schmidhofer, Th., H.-R. Egli, E. Hauser und W. Künzler:
Zur chemischen Untersuchung von Fleisch und
Fleischwaren mit dem "Technicon-AutoAnalyser".
Alimenta 12 (1973), 145
33. Schormüller, J.: Handbuch der Lebensmittelchemie.
Band II/2 Springer-Verlag Berlin, Heidelberg,
New York, 1967, 141
34. Schwab, G.M. and E. Schwab-Agallidis: Kjeldahlization of Urea.
II. Kinetics of the Kjeldahl Reaction.
Angew. Chem. 65 (1953), 418
35. Scott, L.C. and R.G. Meyers: The Use of Potassium Persulfate
in the Determination of Total Nitrogen in
Urine.
J. Am. Chem. Soc. 39 (1917), 1044
36. Shirley, R.L., and W.W. Pecker: Determination of Nitrogen
in Pyridine Ring-Type Compounds by the
Kjeldahl Method.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17 (1945), 437
37. Soler, A.: The Use of Titanium Chloride for Determining
Nitro Nitrogen by the Kjeldahl Method.
Anales fis. y quim. (Madrid) 41 (1945), 789
38. Takeda, A. and J. Senda: Kjeldahl Determination of Nitrogen
in Organic Compounds.
Nogaku Kenkyn (Rept. Ohara Inst. Agr. Biol.)
41 (1954), 97
39. Thalacker, R.: Der Streubereich des Rohproteingehalts bei
Fleischwürstchen-Chargen.
Dt. Lebensmittel-Rdsch. 63 (1967), 65
40. Wicks, L.F. and H.I. Firminger: Perchloric Acid in Micro-
Kjeldahl Digestions.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14 (1942), 856
41. Wilfarth, H.: Zit. nach Bradstreet (8).
42. Willits, C.O., M.R. Coe, and C.L. Ogg: Kjeldahl Determina-
tion of Nitrogen in Refractory Materials.
J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 32 (1949), 118

43. Willits, C.O., H.J. John and L.R. Ross: Zit.nach
Bradstreet (8).
44. Winkler, L.W.: The Volumetric Determination of Ammonia.
Z. Angew. Chem. 26 (1913), 231
45. Wyler, O.: Schweizer Lebensmittelbuch
1. Bd. Eidgen. Drucksachen und Material-
zentrale, Bern 1964, 519

Am Ende meiner Arbeit möchte ich
Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter
für die Überlassung des Themas und
des Arbeitsplatzes sehr herzlich
danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt
Fräulein Dr. Chr. Herrmann für
die wertvollen Anregungen, die
immer gewährte Unterstützung
und die kritische Durchsicht dieser
Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 19. Oktober 1946 wurde ich als zwölftes Kind der Eheleute Dr. jur. Otto Stewens und Julia Stewens, geb. Gudenoge, in Nieukerk am Niederrhein geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Bardeleben-Volksschule in Essen und von 1957 bis 1962 das dortige BMV-Gymnasium.

Nach dem Tode meines Vaters am 7. Februar 1959 übersiedelten wir im Juli 1962 nach München; dort trat ich in das Maria-Ward-Gymnasium ein, wo ich im Juli 1967 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1967/68 studierte ich an der Pädagogischen Hochschule in München-Pasing. Im Sommersemester 1968 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Tiermedizin und bestand dort im Dezember 1973 die Tierärztliche Prüfung.

Im Februar 1974 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

